MARIA ALEJANDRA CLAVIJO SALOMÓN

**Células *Natural Killer* na modulação da
imunidade celular em humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

São Paulo
2016

RESUMO

Clavijo Salomón MA. Células *Natural Killer* na modulação da imunidade celular em humanos. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As células dendríticas (DCs) são componentes centrais da imunidade celular, responsáveis pelo *priming* de linfócitos T naïve. A polarização de linfócitos T é restrita aos sinais fornecidos durante a apresentação do antígeno. Além destes sinais, a origem e a natureza das DCs que induzem diferentes perfis de linfócitos T em seres humanos não é totalmente compreendida. Aqui, nós investigamos a capacidade de células *Natural Killer* (NK) de modular estágios iniciais da diferenciação de DCs e, consequentemente, de impactar na sua função de primar e polarizar linfócitos T naïve. Células NK e monócitos foram obtidos a partir de sangue de doadores saudáveis e purificados separadamente. Células NK (CD3⁻CD56⁺) e monócitos (CD14⁺CD16⁻) foram co-cultivados por 18 horas, tempo após o qual as células NK foram removidas e os monócitos induzidos para se diferenciarem em DCs pela ação de IL-4 e GM-CSF, por 5 dias. As DCs resultantes (Mo-DCs) foram amadurecidas com TNF- α por 24 horas e testadas funcionalmente pela co-cultura com linfócitos T naïve alogênicos, por 5 dias. O fenótipo e função das células foram avaliados por citometria de fluxo, a expressão gênica por *microarray* e as interações célula-célula por microscopia confocal. Comparados a monócitos sozinhos (Mo) ou a monócitos cultivados com células NK separados por uma membrana Transwell® (NK//Mo), somente após contato com as células NK (NK-Mo), monócitos aumentaram a expressão do receptor CD64 e CX3CR1 e a produção das citocinas inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-23p19. NK-Mo apresentaram diferenças na expressão de 345 genes em comparação aos controles, e mostraram principalmente a ativação da via de sinalização de IFN- γ (*Jak2*, *Stat1*) e seus produtos (*Cxcl9*, *Cxcl10*, *Fcgr1a*). Após a diferenciação, NK-Mo deram origem a uma população de DCs (NK-Mo-DCs) com um perfil gênico único, caracterizada pelo aumento da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, CD119, CD64 e CD83. Estas células apresentaram diferenças em 185 genes em comparação aos controles, e mostraram a ativação das vias de sinalização de MMP9, GBP1, STAT4, IL-6, TNF- α e IFN- γ , vias envolvidas no *priming* de respostas do tipo Th1 e Th17. Quando co-cultivadas com linfócitos T naïve alogênicos, NK-Mo-DCs favoreceram a proliferação de células T CD8 com alta expressão de CD28 e com características de Tc1 e Tc17, apresentando expressão de T-bet e ROR γ T junto à produção de IL-17A e potente produção de IFN- γ . Este fenômeno é dependente do contato precoce entre células NK e monócitos precursores de DCs, onde estão envolvidos a interação via o receptor NKp30 e o IFN- γ produzido. Nas etapas iniciais da interação foi visualizado que dois fenômenos mediados pelo contato célula-célula ocorrem: a citotoxicidade induzida por células NK sobre uma população de monócitos e a injeção de IFN- γ por parte de células NK nos monócitos sobreviventes. Esta interação pode ter implicações na compreensão da imunidade adaptativa mediada por linfócitos T CD8 e pode ser explorada para imunoterapia em que a produção de IFN- γ por células T CD8 é necessária ou exacerbada.

Palavras-chave: Células Natural Killer. Monócitos. Células Dendríticas. Linfócitos T CD8. NKp30. IFN- γ .

ABSTRACT

Clavijo-Salomon MA. Natural Killer cells in the modulation of cell-mediated immunity in humans. [Ph. D. (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Dendritic cells (DCs) are central components of cellular immunity, responsible for the priming of naïve T cells. The polarization of T cells is restricted to signals provided during antigen presentation but in addition to these signals, the origin and nature of DCs that induce different T-cell-profiles in humans is not fully understood. Here, we investigated the ability of natural killer cells (NK) to regulate early stages of DC differentiation and consequently to impact on its function to stimulate and polarize naïve T cells. NK cells and monocytes were obtained from healthy donors' blood and purified separately. NK cells (CD3⁻CD56⁺) and monocytes (CD14⁺CD16⁻) were co-cultured for 18 hours, and subsequently, NK cells were depleted and monocytes induced to differentiate into DCs by IL-4 and GM-CSF for 5 days. The resulting DCs (Mo-DCs) were matured with TNF- α for 24 hours and functionally tested by co-culture with naïve allogeneic T cells for 5 days. Phenotype and function of cells were evaluated by flow cytometry, gene expression by microarray and cell-cell interactions by confocal microscopy. Compared to monocytes alone (Mo) or to monocytes cultured with NK cells separated by a *Transwell*® membrane (NK//Mo), only after contact with NK cells (NK-Mo), monocytes increased the expression of CD64 and CX3CR1 and the production of inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-23p19. NK-Mo showed differences in the expression of 345 genes compared to controls, exhibiting the activation of the IFN- γ signaling pathway (*Jak2*, *Stat1*) and its products (*Cxcl9*, *Cxcl10*, *Fcgr1a*). After differentiation, NK-Mo gave rise to a DC population (NK-Mo-DCs) with a unique gene signature, phenotypically characterized by the upregulation of HLA-DR, CD80, CD86, CD119, CD64 and CD83. These cells showed differences in 185 genes compared to controls, and exhibited the activation of MMP9, GBP1, STAT4, IL-6, TNF- α and IFN- γ signaling pathways, which are involved in the priming of Th1 and Th17 responses. When co-cultured with naïve allogeneic T cells, NK-Mo-DCs favored the proliferation of CD8 T cells with high expression of CD28 and features of Tc1 and Tc17, showing concomitant expression of T-bet and ROR γ T with IL-17A production capacity and strong production of IFN- γ . This phenomenon is dependent on the early contact between NK cells and monocytes, in which the interaction via the NKp30 receptor and the IFN- γ produced are involved. During interaction two phenomena mediated by cell-cell contact were visualized: NK cell-mediated cytotoxicity over a population of monocytes and a NK cell' IFN- γ injection into surviving monocytes. This interaction may have implications in the understanding of adaptive immunity mediated by CD8 T cells and can be exploited for immunotherapy in which IFN- γ production by CD8 T cells is required or exacerbated.

Keywords: Natural Killer cells. Monocytes. Dendritic Cells. CD8 T cells. NKp30. IFN- γ .

“Any truth is better than indefinite doubt.”

Sir Arthur Conan Doyle

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é um sistema de reconhecimento que proporciona aos seres vivos uma das características fundamentais que possibilita a vida: a defesa do organismo. Existem dois tipos de mecanismos de defesa imune, o inato e o adaptativo. Dentre as células do sistema imune inato estão as células *Natural Killer* ou NK, que foram inicialmente identificadas 40 anos atrás devido a sua habilidade de lisar células tumorais, sem a necessidade da sensibilização do hospedeiro (Kiessling et al., 1975). Precusores de células NK são encontrados na medula óssea, local onde células NK se diferenciam e da onde saem para entrar na circulação sanguínea, ir para o baço, os linfonodos, diversos órgãos e/ou os tecidos inflamados (Ferlazzo et al., 2004). As células NK correspondem a aproximadamente 15% do total das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e representam uma população de linfócitos que não possuem receptores clonais de reconhecimento de antígenos (TCR ou BCR), nem moléculas CD3 de membrana (Lanier et al., 1986), mas que possuem um repertório complexo de receptores ativadores e inibidores através dos quais reconhecem outras células (Lanier, 2005). Fenotipicamente, estas células são caracterizadas pela expressão da molécula de adesão CD56 e do receptor para fração Fc γ III, CD16 (Ellis et al., 1989; Lanier et al., 1986). Por conta da expressão relativa de CD56, estas células podem se dividir em dois subtipos: células NK CD56^{bright} CD16^{dim/-} que predominam nos linfonodos e se caracterizam por uma alta capacidade na produção de citocinas e uma maior capacidade de proliferação em resposta ao estímulo por IL-2 e células NK CD56^{dim} CD16⁺ que predominam no sangue e se caracterizam por uma maior atividade citotóxica e uma menor capacidade proliferativa (Sutlu, Alici 2009). Mediante sua função citotóxica exercida através da liberação de grânulos de perforina e granzima e promovida pela produção de IFN- γ (Lanier, 2000; Moretta et al., 2002), células NK estão envolvidas na defesa do hospedeiro frente a infecções intracelulares, vírus e células tumorais (Andrews et al., 2005; Biron et al., 1999; Cerwenka et al., 2001; Cincone et al., 1992; Moretta, 2007; Rojas-Pandales et al., 2007; Smyth et al., 2002; Zamai et al., 2007). Contudo, estudos mais recentes sugerem que células NK são mais complexas do que apresenta a sua definição clássica. Hoje em dia, as células NK não são mais consideradas uma população isolada de linfócitos inatos, elas fazem parte das células linfoides inatas (ILCs) e pertencem à categoria de ILCs do grupo 1, a qual compartilham com a subpopulação ILC1 e da qual se diferenciam pela ausência do fator de transcrição T-bet (Spitz et al, 2016). A análise de células NK por citometria de massa tem revelado uma vasta diversidade de subtipos, a qual poderia ir de 6000 até 30000 subtipos de células NK no sangue de um indivíduo saudável, baseado nas diferenças de expressão de

receptores (Horowitz et al., 2013; Lanier, 2014; Strauss-Albee et al., 2015). Além disso, estudos em modelos de infecção por citomegalovírus (CMV) ou de hipersensibilidade de contato através da sensibilização por haptenos, utilizando camundongos deficientes de RAG2, têm mostrado que, na ausência de células NK, não ocorre hiperatividade da resposta após um segundo estímulo, sugerindo que células NK seriam responsáveis pela indução de respostas de *recall*, na ausência de linfócitos T e B. Além de apresentar características de células de memória, estas células NK também apresentaram alta persistência (superior a 4 meses) e capacidade de auto-renovação (Cerwenka, Lanier, 2016; O’Leary et al., 2006; Paust et al., 2010; Reeves et al., 2013; Sun et al., 2009). Além de fascinantes, estes achados representam a quebra de um paradigma na imunologia, uma vez que a memória e a especificidade contra um antígeno são características exclusivamente atribuídas aos linfócitos da resposta imune adaptativa.

Funcionalmente, as células NK tem sido amplamente estudadas por sua capacidade citotóxica, porém se conhece menos sobre sua capacidade de modular a resposta imune, que, no entanto, vem recebendo maior atenção (Askenase et al., 2015; Ferlazzo 2005; Ferlazzo et al., 2009; Goldszmid et al., 2012; Moretta et al., 2003; Munz et al., 2005, Osada et al., 2006). Como consequência da sua habilidade de produzir grandes quantidades de citocinas, estas células poderiam ter um papel regulador e inclusive supressor da resposta imune (Trinchieri, 1989; Zhang, 2006). Têm-se descrito várias interações reguladoras das células NK com diferentes tipos de células do sistema imune como: neutrófilos (Costantini et al., 2010), macrófagos (Nedvetzki et al., 2007), linfócitos T CD4 (Zingoni et al., 2004) e CD8 (Kos et al., 1995), linfócitos B (Yuan et al., 1994), com as células objeto de estudo em nosso laboratório, as células dendríticas (Deauevieu et al., 2015; Fernandez et al., 1999; Kalinski et al., 2006; Zhang et al., 2007; Ferlazzo et al., 2009;) e com um de seus precursores, os monócitos (Askenase et al., 2015; Geldhof et al., 2002; Goldszmid et al., 2012).

As células dendríticas (DCs) são as mais potentes células apresentadoras de antígeno do sistema imune, que a diferença de outras células apresentadoras, são capazes de ativar linfócitos T naïve (Steinman, Inaba, 1999). As DCs se diferenciam na medula óssea a partir de precursores hematopoiéticos únicos ou nos tecidos inflamados a partir de monócitos sanguíneos (Langlet et al., 2012; Merad et al., 2013; Sallusto, Lanzavecchia, 1994; Segura et al., 2013). DCs no estágio imaturo (iDCs) circulam pelo sangue vigiando

constantemente o equilíbrio local. Em situações patológicas as iDCs capturam e processam os antígenos e amadurecem em resposta aos estímulos recebidos. Durante o processo de maturação, as DCs migram para órgãos linfoides secundários, carregando antígenos capturados no tecido e que serão apresentados a linfócitos T naïve, induzindo sua ativação, diferenciação e proliferação em linfócitos efetores ou reguladores (Steinman, Inaba, 1999). Desta forma, as DCs fazem uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa e participam no desencadeamento de respostas imunes, tanto aquelas efetivas para o controle de situações patológicas quanto aquelas que promovem as próprias doenças, como no caso das doenças autoimunes (Banchereau, Steinman, 1998; Steinman, 2001, 2012; Thery, Amigorena, 2001). As DCs são, então, consideradas como as únicas células do sistema imune capazes de dar início, modular e modificar o padrão de uma resposta imune específica (Steinman, Inaba, 1999; Steinman, 2012).

As formas imaturas e maduras de DCs apresentam diferenças fenotípicas que por sua vez se correlacionam com diferentes funções. As DCs imaturas (iDCs) se caracterizam pela menor expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. As iDCs também possuem baixa expressão do receptor para quimiocina 7 (CCR7) e alta expressão do receptor para quimiocina 5 (CCR5), o que significa que estas células possuem baixa capacidade migratória para áreas onde linfócitos T encontram-se nos órgãos linfóides secundários (Steinman, 2001; Steinman, 2012). Na homeostase, as iDCs têm duas funções: estão encarregadas do monitoramento constante do microambiente através de uma grande capacidade endocítica e fagocítica e, ao possuírem um baixo potencial de ativação de linfócitos T efetores ao mesmo tempo em que possuem maior potencial tolerogênico, mantêm o estado basal de tolerância do sistema. Esta última função depende de sua capacidade de induzir, na periferia, linfócitos T reguladores (Cools et al., 2008) que, junto aos que foram gerados durante a tolerância central no timo (Lederberg, 1959; Itoh et al., 1999), mantêm suprimidas as atividades de outras células do sistema imune, impedindo que o sistema reaja contra antígenos inócuos e permitindo que DCs maduras (mDCs) foquem a resposta contra patógenos (Steinman, 2001). Este fenômeno ocorre porque, quando as iDCs reconhecem “perigo” (Matzinger, 2002), sofrem mudanças fenotípicas e funcionais que as levam a se tornarem mDCs. Estas células perdem a expressão de CCR5 e ganham alta expressão de CCR7, CD80, CD86, CD40 e CD83, diminuem sua capacidade endocítica e fagocítica e ganham um grande potencial de ativação de linfócitos T (Steinman, 2001; Steinman, 2012). O processo de

maturação está extremamente envolvido com a migração das DCs da periferia aos órgãos linfoides, e é durante esse percurso que DCs imaturas passam a ser maduras (Banchereau et al., 2000). Uma vez no linfonodo, as DCs são capazes de ativar linfócitos T através de três sinais: o primeiro sinal é dado pela apresentação do antígeno no contexto de moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II; o segundo é dado pela ligação das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 com a contraparte expressa na membrana dos linfócitos T CD40-L, CD28 ou CTLA-4, respectivamente; o terceiro é dado pelas citocinas e quimiocinas, por elas secretadas ou já presentes no microambiente (Reis e Sousa, 2006; Walsh, Mills, 2013).

Existem diversos subtipos de DCs. As primeiras a serem descritas foram as células de Langerhans, descobertas em 1868 pelo cientista alemão Paul Langerhans (Langerhans, 1868). Existem também as DCs intersticiais, plasmocitóides, veliformes, interdigitais e foliculares (Kushwah et al., 2011). Embora em humanos diversas células possam ser precursoras das DCs, os monócitos, células essenciais da resposta imune inata, também possuem a capacidade de se diferenciar *in vitro* (Lanzavecchia, Sallusto 1994) e *in vivo* (Randolph et al., 1999) em células dendríticas, constituindo assim, o subtipo de DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs). Embora a aquisição da especialização funcional de monócitos *in vitro* seja controlada por fatores de ativação e diferenciação razoavelmente conhecidos, como a IL-4 e o GM-CSF, o mecanismo pelo qual ocorre a diferenciação dos monócitos em DCs *in vivo*, continua sendo objeto de estudo (Cheong et al., 2009; Goldszmid et al., 2012). Recentemente, foi descrita uma população de DCs encontrada em fluidos inflamatórios de pacientes com câncer e artrite reumatoide, que compartilha um perfil gênico similar ao de DCs derivadas *in vitro* a partir de monócitos e que estão envolvidas com a manutenção de respostas do tipo Th17 (Segura et al., 2013). Na atualidade, os estudos em DCs visam a entender como o processo de diferenciação e maturação é modulado assim como também compreender a origem e a natureza das DCs que induzem anergia, tolerância ou respostas efectoras (Steinman, 2012). Ralph Steinman, descobridor do papel central das DCs na resposta imune, assinalou em sua última revisão que existe uma necessidade de identificar a constelação de mudanças que levam as DCs ao desencadeamento de respostas imunes apropriadas e inapropriadas, e chamou a atenção sobre a necessidade de conhecer os eventos que ocorrem quando uma DC ou seu precursor encontra uma célula do sistema imune inato, como por exemplo uma célula NK (Steinman, 2012).

Durante uma resposta imune existe uma grande chance de precursores de DCs e células NK se encontrarem. Isto pode acontecer na medula óssea, nos linfonodos ou nos tecidos periféricos inflamados, onde os dois tipos celulares são recrutados por quimiocinas liberadas nas etapas iniciais das respostas inflamatórias, tais como CCL2 e CCL5 (Askenase et al., 2015; Geldhof et al., 2002; Goldszmid et al., 2012; Moretta et al., 2006). O fato dessa interação ocorrer no começo da resposta imune inata pode, portanto, influenciar a diferenciação e maturação de DCs e por fim, a resposta imune adaptativa (Ferlazzo et al., 2004; Maillard et al., 2003). Contudo, a mais estudada é a interação de células NK com DCs já diferenciadas, fato refletido no número crescente de publicações que vêm reportando as múltiplas interações entre as células, e adotando o termo “*crossstalk*” para descrever a relação de cooperação que existe entre elas. Através da produção de IL-15, DCs promovem a sobrevivência, proliferação e ativação de células NK (Karimi et al., 2008; Kim et al., 2004; Steel et al., 2012), que como consequência aumentam sua produção de IFN- γ e sua capacidade citotóxica (Fernandez et al., 1999; Khalil et al., 2008; Osada, 2006; Woo et al., 2006). Células NK ativadas induzem, por sua vez, a maturação de DCs através da produção de TNF- α , via ligação com o receptor Nkp30 ou CD337 (Ferlazzo et al., 2003; Ferlazzo, 2005; Munz et al., 2005; Vitale et al., 2005), e essas DCs são caracterizadas por uma habilidade excepcional na produção de IL-12p70, inclusive na presença de fatores imunossupressores (Vieira et al., 2000), o que as leva a promover respostas do tipo Th1 por linfócitos T CD4⁺ (Maillard et al., 2005).

Subtipos de células NK que, acredita-se, exercem funções diferentes no sistema imune (Caligiuri 2008; Sutlu, Alici 2009), poderiam interagir de formas distintas com DCs e seus precursores. Foi visto que, na presença do líquido sinovial derivado de pacientes com artrite reumatóide e artrite psoriática, as células NK CD56^{bright}CD16⁻ na presença de IL-15 e mediante contato direto, desencadeiam a diferenciação de monócitos em DCs que mantêm o ambiente inflamatório, o que, por sua vez, favoreceria a doença (Zhang et al., 2007). Da mesma forma, em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico foi reportado o aumento exagerado na produção de IFN- α por parte de DCs plasmocitóides (pDCs) estimuladas com imunocomplexos, só na presença de células NK CD56^{dim}CD16⁺. A exposição prolongada do sistema imune a IFN- α incrementaria o risco de perder a tolerância ao próprio e conduziria a autoimunidade, *loop* inflamatório sustentado pela interação entre células NK e pDCs (Hagberg et al., 2011).

Por outro lado, sabe-se que células NK são capazes de mediar a lise de DCs imaturas irresponsivas, caracterizadas pela baixa expressão de moléculas do MHC de classe I na membrana, mediante um fenômeno conhecido como *DC editing* (Della Chiesa et al., 2003; Ferlazzo et al., 2003; Moretta et al., 2006; Spaggiari et al., 2001). Esta função das células NK serviria como “controle de qualidade” de DCs e permitiria maximizar a eficiência do sistema de apresentação de antígenos (Zhang et al., 2006). Recentemente Morandi e colaboradores mostraram que o fenômeno ocorreria também *in vivo*, onde a remoção de DCs pouco imunogênicas era dependente de células NK e estaria associada com a seleção de DCs com maior capacidade de induzir respostas protetoras contra o tumor (Morandi et al., 2012). Até o momento, o receptor ativador NKp30 em células NK tem sido relacionado diretamente a essa função (Ferlazzo et al., 2003). Recentemente, a molécula B7H6 foi descrita como o alvo do receptor, expressa em células tumorais e em monócitos derivados de pacientes com sepse, porém, a sua expressão em células de indivíduos saudáveis não é totalmente compreendida (Brandt et al., 2009; Matta et al., 2013). Juntos estes dados indicam que células NK poderiam ter um papel importante na modulação de DCs e seus precursores; daí a importância de estudar tal função na homeostase e no contexto de doenças onde seu status ainda é desconhecido, como é o caso do câncer.

Foi descrito que no câncer, os monócitos, precursores de DCs, são alvo de mecanismos de escape tumoral que impedem sua diferenciação *in vitro* em DCs totalmente funcionais (Hasebe et al., 2000; Neves et al., 2005., Onishi et al., 2002, 2005). Além disso, iDCs que expressam baixos níveis de moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 e que não respondem a estímulos de maturação como TNF- α e CD40L, têm sido encontradas em alta frequência infiltrando tumores (Baleeiro et al., 2008). Funcionalmente, estas células promovem a supressão, inibindo as respostas por linfócitos T efetores e induzindo a proliferação de linfócitos T reguladores (Almand et al., 2001). E inclusive, iDCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama apresentam esse viés que induz a proliferação de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ com capacidade supressora (Ramos et al., 2012). Além do mais, o número elevado de iDCs infiltradas nos tumores tem se associado com recidiva e metástases (Young et al., 1997). Como consequência dos defeitos descritos em monócitos e em iDCs derivadas de pacientes, a diferenciação e ativação destas células resulta em DCs "maduras" de pobre qualidade.

Números baixos de DCs maduras circulantes têm sido encontrados no sangue de pacientes com câncer (Della Bella et al., 2003), sugerindo que o defeito poderia ser sistêmico e, além disso, mantido por fatores solúveis supressores produzidos pelos tumores como TGF- β , IL-10, IL-6, M-CSF, VEGF, gangliosídeos e prostanóides (Pinzon-Charry et al., 2005).

Contudo, a incrível capacidade das DCs de comandar as respostas imunológicas as faz atraentes desde o ponto de vista terapêutico, já que vacinas de células dendríticas podem ser aproveitadas para o tratamento do câncer. A estratégia desenvolvida em nosso laboratório é um bom exemplo. Mediante um esquema de vacinação, com doses a cada 6 semanas, de uma vacina composta por DCs maduras alogênicas fundidas com células tumorais autólogas, Barbuto et al., mostrou a estabilização da doença em mais de 70% de 35 pacientes com câncer renal ou melanoma metastáticos (Barbuto et al., 2004). Além disso, surgiu um dado interessante: os monócitos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico ou com a vacina apresentaram uma recuperação em sua capacidade de diferenciação em DCs (Neves et al., 2005, Azevedo et al., 2007; Clavijo-Salomon et al., 2015). Esta melhora permitiu propor que a ausência do tumor e o reforço com as vacinas, além de ajudar a montar uma resposta contra a tumor, fizeram com que se recuperassem, funcionalmente, precursores de DCs. No entanto o mecanismo pelo qual ocorre esta melhora é ainda desconhecido.

O fato de células NK ativarem iDCs e induzirem nelas uma grande capacidade de produção de IL-12p70, que as torna células indutoras de respostas do tipo Th1 (Maillard et al., 2003), poderia ter implicações em imunoterapia contra tumores. Se sabe que a eliminação de células NK afeta as respostas antitumorais naturais (Tosi et al., 2004). Além disso foi visto que camundongos “depletados” de células NK e submetidos a vacinação com DCs pulsadas com antígenos tumorais, diminuíram significativamente a atividade específica citotóxica de linfócitos T CD8⁺ (CTLs) e sua produção de IFN- γ , afetando assim a resposta antitumoral da vacina (Kim et al., 2004). No entanto, quando as células NK são reconstituídas, as DCs se recuperam na sua capacidade de primar CTLs específicos contra células tumorais (Tosi et al., 2004, Wong et al., 2011). Hoje em dia estão em andamento algumas pesquisas clínicas de fase I e II de imunoterapia contra o câncer, baseadas em Mo-DCs ativadas com células NK (Kalinski et al., 2006, 2009). Por outro lado, a ativação de células NK por parte de vacinas baseadas em DCs, pode

contribuir para uma resposta antitumoral mediada pela citotoxicidade dessas células e tal ativação pode ser correlacionada com a resposta clínica observada frente à vacina (Anguille et al., 2011; Bray et al., 2011; Osada et al., 2006). Além disso, o processo de *DC editing* poderiam também contribuir para a “escolha” de DCs com maior capacidade de indução de respostas protetoras contra o câncer, o que significa que células NK poderiam contribuir na seleção natural da população de DCs que efetivamente contribui para a eliminação dos tumores (Morandi et al., 2012).

Por outro lado, uma prova legítima da importância das células NK em humanos é proporcionada pelo quadro clínico de pacientes portadores da imunodeficiência primária ou CNKD – *classical NK cell deficiency*, em que as células NK CD3⁺CD56⁺ estão muito reduzidas ou ausentes no sangue periférico dos pacientes, em medições sequenciais (Orange, 2006, 2012). 8 dos 19 casos descritos na literatura foram pacientes que morreram prematuramente; infecções virais - EBV, CMV, VZV, bem como infecção por micobactérias e câncer foram as causas de morte (Orange, 2013). O diagnóstico de CNKD é muito rigoroso: os critérios não envolvem outras anormalidades tais como deficiências no mecanismo citotóxico compartilhado com CTLs (Orange, 2006, 2013). Isto significa que os números de CTLs e sua função em pacientes com CNKD são normais. Mas, por que uma resposta de CTL protetora contra microrganismos intracelulares e tumores não pode ser montada adequadamente, na ausência de células NK? Uma possibilidade suportada por evidência recente é o papel que as células NK desempenham na apresentação cruzada. DCs na presença de células NK e células K562 exibem uma forte capacidade para induzir CTLs antígeno-específicas. TNF- α e IFN- γ jogam e papel importante, mas a presença de K562 é necessária (Deauvieu et al., 2015; Mailliard et al., 2003; Wong et al., 2011). Isto sugere que as células NK podem sustentar a apresentação cruzada através do fornecimento de detritos antigénicos gerados pela lise de seus alvos e através da sua produção de citocinas. No entanto, levando em consideração que outras células do sistema imune também são capazes de fornecer detritos antigénicos para apresentação cruzada e que DCs podem também internalizar detritos na ausência de células NK, o papel auxiliar de células NK na apresentação cruzada explicaria apenas parcialmente por que os pacientes com CNKD falham em montar uma resposta de CTL protetora.

Apesar dos inúmeros dados mostrando o efeito das células NK sobre a função de DCs, ainda não se sabe se as mesmas modulam também seu processo de diferenciação. Dados recentes obtidos em modelos murinos de infecção por *Toxoplasma gondii* apontam a que o IFN- γ produzido pelas células NK tem um papel importante na diferenciação e função de células mielóides (Askenase et al., 2015; Goldszmid et al., 2012). Durante a infecção peritoneal, o IFN- γ secretado por células NK foi responsável pela reestruturação dos componentes celulares no local da inflamação: os fagócitos residentes foram substituídos por monócitos que se diferenciaram *in situ* em DCs inflamatórias, sendo estas células a principal fonte de IL-12, citocina requerida para dar início à resposta imune adaptativa contra o patógeno (Goldszmid et al., 2012). No modelo de infecção gastrointestinal, a IL-12 produzida no intestino teve um efeito sistêmico, ativando células NK residentes na medula óssea; o IFN- γ derivado das células NK ativadas promoveu a diferenciação de precursores monocíticos em monócitos com função reguladora. Estes monócitos reguladores, liberados da medula óssea para a corrente sanguínea, foram no local da infecção e promoveram a resolução de inflamação evitando assim o dano tecidual (Askenase et al., 2015). Estes dois trabalhos mostram que os mecanismos pelos quais as células NK modulam a resposta imune são complexos e sofisticados; encorajam o estudo dos mecanismos pelos quais células NK modulam células mielóides em humanos.

Nós propomos que células NK poderiam ter um papel nas etapas precoces da diferenciação de monócitos humanos em células dendríticas e, como consequência afetariam também a imunidade celular adaptativa. Além disso, e levando em consideração que a grande maioria das abordagens imunoterapêuticas contra o câncer parte dos monócitos para obter DCs, é pertinente estudar se as células NK podem contribuir, durante a diferenciação, para a seleção de uma população de Mo-DCs de “melhor qualidade”, ou, inclusive, ajudar a corrigir os defeitos que monócitos derivados de pacientes com câncer carregam e se refletem nas DCs às quais dão origem (Clavijo-Salomon et al., 2015a; Hasebe et al., 2000; Neves et al., 2005., Onishi et al., 2002; Onishi et al., 2005; Ramos et al., 2012). Considerando que existem diferentes subtipos de monócitos no sangue (Cros et al., 2010; Zimmermann et al., 2012), que podem subsequentemente se diferenciar a DCs, e que, os nossos dados preliminares sugerem que as interações precoces entre células NK e monócitos (mas não com Mo-DCs imaturas ou maduras) influenciam a magnitude e qualidade do perfil induzido em

linfócitos T CD8 (Clavijo-Salomon et al., 2015b), o objetivo deste trabalho foi compreender a profundidade o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre e conhecer suas consequências para imunidade celular em humanos.

*“Once you eliminate the impossible, whatever remains,
no matter how improbable, must be the truth.”*

Sir Arthur Conan Doyle

6 CONCLUSÃO

Figura 42 – Células *Natural Killer* na modulação da imunidade celular

1. Após contato com monócitos CD14⁺CD16^{neg}, células NK apresentaram um aumento na expressão de marcadores de ativação, moléculas envolvidas com sua função citotóxica, e capacidade de produção de IFN- γ e GM-CSF, comparadas a células NK sozinhas.
2. Após contato com as células NK, monócitos CD14⁺CD16^{neg} (NK-Mo) aumentaram a expressão do receptor CD64 e CX3CR1, a produção das citocinas inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-23p19 e apresentaram ativação da via de sinalização de IFN- γ .
3. Nas etapas iniciais da interação entre células NK e monócitos ocorreram dois fenômenos dependentes do contato entre as células: a morte de monócitos mediada por células NK e a transferência de IFN- γ de células NK a monócitos sobreviventes.
4. NK-DCs apresentaram um perfil gênico único, caracterizadas pelo aumento da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, CD119, CD64 e CD83, e pela ativação das vias de sinalização de MMP9, GBP1, STAT4, IL-6, TNF- α e IFN- γ .
5. NK-DCs favoreceram o *priming* de repostas do tipo Tc1 e Tc17 em linfócitos T CD8 e a produção de IL-21 por linfócitos T CD4. Este fenômeno é dependente do contato precoce entre células NK e monócitos precursores de DCs, onde estão envolvidos a interação via o receptor Nkp30 e o IFN- γ produzido.
6. Em conjunto, esses dados fornecem detalhes sobre os mecanismos pelos quais as células NK modulam a imunidade celular em humanos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of Immunology*. 2001;166 (1): 678-89.
- Andrews DM, Andoniou CE, Scalzo A, Van Dommelen SLH, Wallace EM, Smyth M, Degli-Esposti MA. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Molecular immunology*. 2005;42(4):547-55.
- Anguille S, Lion E, Smits E, Berneman ZN, van Tendeloo VF. Dendritic cell vaccine therapy for acute myeloid leukemia : questions and answers. *Hum Vaccin*. 2011 May;7(5):579-84.
- Askenase MH, Han S-J, Byrd AL, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity*. 2015 16–6;42(6):1130–42.
- Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, Pinto CA, Ramos O, Gross JL, Haddad F, Younes RN, Tomiyoshi MY, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor- α in lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Sep;57(9):1335-45.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Dec;53(12):1111-8.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:189-220.
- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R.. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999 May;97(1):159–65.
- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1495–503.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bray SM, Vujanovic L, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Vaccines Positively Impact Natural Killer and Regulatory T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:249281.

Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Münz C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R α . *J Clin Invest*. 2007 Nov 1;117(11):3316–29.

Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-469.

Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature reviews. Immunology* 2001;1(1):41-9.

Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb;16(2):112–23.

Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DD, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon C, Park C.Y, Steinman RM. Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas. *Cell*. 2010 Oct 29;143(3):416-29.

Chong WP, Panhuys N van, Chen J, Silver PB, Jittayasothorn Y, Mattapallil MJ, et al. NK-DC crosstalk controls the autopathogenic Th17 response through an innate IFN- γ –IL-27 axis. *J Exp Med*. 2015 Set 21; 212(10):1739–52.

Cincone E, Moretta A, Moretta L. Specific functions of human NK cells. *Immunology letters*. 1992 ;31(2):99-103.

Clavijo-Salomon MA, Ramos RN, Crippa A, Pizzo CR, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: could it be a general phenomenon? *Cancer Immunol Immunother*. 2015a Feb;64(2):161–71.

Clavijo-Salomon MA, Steponavicius K, Pizzo CR, Barbuto JAM.. Early contact-dependent interactions between natural killer cells and monocytes influence monocyte-derived dendritic cell function: implications for T cell polarization. *Frontiers in Immunology*. 2015b;6.
http://www.frontiersin.org/Community/AbstractDetails.aspx?ABS_DOI=10.3389/connf.fimmu.2015.05.00340

Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Pizzolo G, Cassatella MA. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells *Int. Immunol*. 2010;22(10): 827-38.

Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Ponsaerts P. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med*. 2008 Apr;12(2):690-700.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):375–86.

Deauvieu F, Ollion V, Doffin AC, Achard C, Fonteneau JF, Verronese E, Durand I, Ghittoni R, Marvel J, Dezutter-Dambuyant C, Walzer T, Vie H, Perrot I, Goutagny N, Caux C, Valladeau-Guilemond J. Human Natural Killer Cells Promote Cross-Presentation of Tumor Cell-Derived Antigens by Dendritic Cells. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):1085-94.

Della Bella S1, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M, Villa ML. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2003 Oct 20;89(8):1463-72.

Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. 2003 Jun ;33(6):1657-66.

Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *J Immunol*. 2010 3–15;184(6):3284–97.

Ellis TM, Fisher RI. Functional heterogeneity of Leu 19 “bright” and Leu 19 “dim” lymphokine-activated killer cells. *J.Immunol*. 1989 Apr 15;142(8):2949-54.

Ferlazzo G, Morandi B, D’Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A, Moretta L. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *European Journal of Immunology*. 2003;33(2):306-13.

Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J. Immunol*. 2004 Feb 1;172:1333-9.

Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *PNAS*. 2004 11–23;101(47):16606–11.

Ferlazzo G. Natural killer and dendritic cell liaison: Recent insights and open questions. *Immunology letters*. 2005;101:12-17.

Ferlazzo G., Munz C. Dendritic cell interactions with NK cells from different tissues. *J Clin Immunol*. 2009; 29:265–273.

Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*. 1999;5(4):405-11.

Geldhof AB, Van Ginderachter JA, Liu Y, Noël W, Raes G, De Baetselier P.

Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood*. 2002;100(12):4049-4058.

Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, Kelsall B, Trinchieri G, Sher A. NK Cell-Derived Interferon- γ Orchestrates Cellular Dynamics and the Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells at the Site of Infection. 2012 Jun 29; 36(6):1047-59.

Hagberg N, Berggren O, Leonard D, Weber G, Bryceson YT, Alm GV, Eloranta ML, Rönnblom L. IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 β and LFA-1. 2011 May. 1;186(9):5085-94.

Hasebe H, Nagayama H, Sato K, Enomoto M, Takeda Y, Takahashi TA, Hasumi K, Eriguchi M. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed Pharmacother*. 2000 Jul;54(6):291-8.

He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8+ IL-17 producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):6852-8.

Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B, et al. Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood*. 2009 Jul 16; 114(3):596-9.

Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 23;5(208):208ra145.

Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, DeJong CS, Shin H, et al. Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8+ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science*. 2008 Jul 18;321(5887):408-11.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J Immunol*. 1999 5-1;162(9):5317-26.

Kalinski P, Nakamura Y, Watchmaker P, Giermasz A, Muthuswamy R, Mailliard RB. Helper roles of NK and CD8+ T cells in the induction of tumor immunity. Polarized dendritic cells as cancer vaccines. 2006; 36(1-3):137-46.

Karimi K, Boudreau JE, Fraser K, Liu H, Delanghe J, Gauldie J, Xing Z, Bramson JL, Wan Y. Enhanced Antitumor Immunity Elicited by Dendritic Cell Vaccines Is a Result of Their Ability to Engage Both CTL and IFN γ -producing NK Cells. *Mol Ther*. 2008 Feb;16(2):411-8.

Karimi K, Boudreau JE, Fraser K, Liu H, Delanghe J, Gauldie J, Xing Z, Bramson JL, Wan Y. Enhanced Antitumor Immunity Elicited by Dendritic Cell Vaccines Is a Result of Their Ability to Engage Both CTL and IFN γ -producing NK Cells. *Molecular Therapy*. 2008 Feb;16(2):411-8.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 1975; **5**:112–117.

Kim A, Noh YW, Kim KD, Jang YS, Choe YK, Lim JS. Activated natural killer cell-mediated immunity is required for the inhibition of tumor metastasis by dendritic cell vaccination. *Exp Mol Med.* 2004 Oct 31;36(5):428-43.

Kim TS, Gorski SA, Hahn S, Murphy KM, Braciale TJ. Distinct dendritic cell subsets dictate the fate decision between effector and memory CD8(+) T cell differentiation by a CD24-dependent mechanism. *Immunity.* 2014 Mar 20;40(3):400–13.

Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol.* 2009 Feb 15;182(4):1794-8.

Kos FJ, Englemann EG. Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. *J Immunol.* 1995;155: 578-84.

Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* 2011 Aug;133(4):409-19.

«Über die nerven der menschlichen haut» “Ao longo dos nervos da pele humana”. *Archives of Pathological Anatomy.* 1868; (44): 325-37.

Lanier LL, Phillips JH. Ontogeny of natural killer cells. *Nature.* 1986; 319: 269-70.

Lanier L, Le A, Civin C, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T Lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136: 4480-6.

Lanier L. The origin and functions of natural killer cells. *Clinical immunology.* 2000; 95(1):S14-S18.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:225-74.

Lanier LL. Of snowflakes and natural killer cell subsets. *Nat Biotechnol.* 2014 Feb;32(2):140–2.

Lanzavecchia A, Sallusto F. A efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1109-18.

Lederberg J. Genes and antibodies. *Science.* 1959 Jun 19;129(3364):1649-53.

Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. . Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol.* 2003;171(5):2366-73.

Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, Kalinski P. IL-18 induced CD83+CCR7+ NK Helper Cells. *J.Exp.Med.* 2005 Oct 3;202(7):941-53.

Matta J, Baratin M, Chiche L, Forel JM, Cognet C, Thomas G, Farnarier C, Piperoglou C, Papazian L, Chaussabel D, Ugolini S, Vély F, Vivier E.. Induction of B7-H6, a Ligand for the Natural Killer Cell-activating Receptor Nkp30, in Inflammatory Conditions. *Blood.* 2013 Jul 18; 122 (3): 394–404.

Mathew SO, Rao KK, Kim JR, Bambard ND, Mathew PA. Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol.* 2009 Jun;39(6):1632–41.

Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):301–5.

Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563–604.

Morandi B., Mortara L., Chiossone L, Accolla R.S., Mingari M.C., Moretta L., Moretta A., Ferlazzo G. Dendritic Cell Editing by Activated Natural Killer Cells Results in a More Protective Cancer-Specific Immune Response. *PloS One.* 2012; 7(6): e39170.

Moretta A, Bottino C, Mingari M.C, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell?. *Nature Immunology.* 2002;3(1):6-8.

Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine.* 2003;21: S2/38–S2/42.

Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Effector and regulatory events during natural killer–dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:219-28.

Moretta L. NK cell-mediated immune response against cancer. *Surgical oncology.* 2007;16 suppl(1):S3-5.

Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2005;202(2):203-7.

Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, Trowsdale J, Vivier E, Gordon S, Davis DM. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood.* 2007; 109:3776-85.

Neumann D. Role of the Histamine H4-Receptor in Bronchial Asthma. *Handb Exp Pharmacol.* 2016 Oct 8.

Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Câmara-Lopes LH, Barbuto JA. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell–autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Jan;54(1):61-6.

O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol.* 2006 May;7(5):507–16.

Onishi H, Morisaki T, Baba E, Kuga H, Kuroki H, Matsumoto K, Tanaka M, Katano M. Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer. *Clin Immunol.* 2002 Dec;105(3):286-95.

Onishi H, Morisaki T, Kuroki H, Matsumoto K, Baba E, Kuga H, Tanaka M, Katano M. Evaluation of a dysfunctional and short-lived subset of monocyte-derived dendritic cells from cancer patients. *Anticancer Res.* 2005 Sep-Oct;25(5):3445-51.

Orange JS. Human Natural Killer Cell Deficiencies. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2006; 6 (6): 399–409.

Orange JS. Unraveling Human Natural Killer Cell Deficiency. *The Journal of Clinical Investigation.* 2012; 122 (3): 798–801.

Orange, JS. Natural Killer Cell Deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):515-25.

Osada T, Clay T, Hobeika A, Lysterly K, Morse M. NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55:1122-1131.

Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):500–8.

Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1505–16.

Pinzon-Charry A, Maxwell T, López JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. 2005 Oct;83(5):451-61.

Ramos RN, Chin LS, Dos Santos AP, Bergami-Santos PC, Laginha F, Barbuto JA. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep;92(3):673-82.

Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Li H, Schafer JL, et al. Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat Immunol.* 2015 Sep;16(9):927–32.

Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jun;6(6):476-83.

Roda-Navarro P, Reyburn HT. Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *FASEB J.* 2007 Jun 1; 21(8):1636–46.

Rojas-Pandales F, Bolaños N, Mercado M, González JM, Cuellar A, Cifuentes-Rojas C. Reference values of natural killer cells (NK and NKT) on blood donors in Bogota. *Acta Médica Colombiana.* 2007;32(3):124-128.

Saligrama N, Case LK, del Rio R, Noubade R, Teuscher C. Systemic lack of canonical histamine receptor signaling results in increased resistance to autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2013 Jul 15;191(2):614–22.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109–18.

Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):336–48.

Smyth M, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural killer cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2: 850–61.

Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L, Poggi A. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. 2001 Jun;31(6):1656–65.

Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol*. 2016 Jul;17(7):758–64.

Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. 2012 Jan;33(1):35–41.

Steinman RM, Inaba K. (1999). Myeloid dendritic cells. 1999 Aug;66(2):205–8.

Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med*. 2001 May;68(3):160–6.

Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1–22.

Steponavicius-Cruz K, Freitas VM, Barbuto JAM. Dendritic Cells and T Lymphocytes Interactions in a Novel 3D System. *Procedia Engineering*. 2013;59:166–73.

Stonier SW, Schluns KS. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 2010 Jan 4;127(2):85–92.

Strauss-Albee DM, Fukuyama J, Liang EC, Yao Y, Jarrell JA, Drake AL, et al. Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Science Translational Medicine*. 2015 Jul 22;7(297):297ra115–297ra115.

Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):557–61.

Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. 2009 Aug;266(2):154–81.

Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):45-51.

Tosi D, Valenti R, Cova A, Sovenia G, Huber V, Pilla L, Arienti F, Belardelli F, Parmiani G, Rivoltini L. Role of cross-talk between IFN- α -induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8⁺ T cell responses against human tumor antigens. 2004 May 1;172(9):5363-70.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989; 47: 187-376.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):133-46.

Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kaliński P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. 2000 May 1;164(9):4507-12.

Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, Moretta A. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF and IFN released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):566-71.

Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in Immunology*. 2013 Nov 1;34(11):521–30.

Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Sep;5 Suppl 1:S49–59.

Wang H, Zheng X, Wei H, Tian Z, Sun R. Important Role for NKp30 in Synapse Formation and Activation of NK Cells. *Immunol Invest*. 2012 Jan 5;41(4):367–81.

Wong JL, Mailliard RB, Moschos SJ, Edington H, Lotze MT, Kirkwood JM, Kalinski P. Helper activity of natural killer cells during the dendritic cell-mediated induction of melanoma-specific cytotoxic T cells. 2011;34(3):270-8.

Woo CY, Clay TM, Lyerly HK, Morse MA, Osada T. Role of natural killer cell function in dendritic cell-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2006 Feb;5(1):55-65.

Yen H-R, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, et al. Tc17 CD8 T Cells: Functional Plasticity and Subset Diversity. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):7161–8.

Young MR, Wright MA, Lozano Y, Prechel MM, Benefield J, Leonetti JP, Collins SL, Petruzzelli GJ. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34⁺ natural suppressor cells. 1997 Feb 20;74(1):69-74.

Yuan D, Koh CY, Wilder JA. Interactions between B lymphocytes and NK cells. *FASEB J*, 1994; 8 (13): 1012-18.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK Cells and Cancer. *The journal of immunology*. 2007; 178: 4011-16.

Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: Do “NK-reg cells” exist?. *Cellular & Molecular immunology*. 2006; 3(4); 241-254.

Zhang A, Colmenero P, Purath U, Teixeira de Matos C, Hueber W, Klareskog L, Tarner I, Engleman E, Soderstrom K. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood*. 2007;110:2484-93.

Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physio*. 2012;3:56.

Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40L interaction. *J Immunol*. 2004;173:3716- 24.

Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:157–74.